©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Kultur und Ernährungsphysiologie der Gattung *Pilobolus*[1]

Von

Egon Bersa

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

(Vorgelegt in der Sitzung am 26. Juni 1930)

Einleitung

Pilobolus ist bekanntlich in der Natur leicht aufzufinden und auf sterilisiertem Mist unschwer und beliebig lange zu kultivieren (Brefeld, Klein, Palla). Ebenso mühelos gelingt die Kultur auf sterilisiertem Mistdekokt (Brefeld). Immerhin scheint *Pilobolus* nicht anspruchslos zu sein, denn mit einer einzigen Ausnahme ist der Pilz bisher nur auf Exkrementen gefunden worden. Auf anderen Substraten gedeiht er nicht (oder nicht ohne weiteres), wie insbesonders Kulturversuche von Pringsheim und Czurda zeigen, die sich vergeblich bemühten, *Pilobolus* auf verschiedenen Agarnährböden zu kultivieren. Sie verwendeten Agar mit Mistdekokt mit und ohne Zucker, mit Heudekokt und Zucker und Würzeagar. »Letzterer erwies sich als am wenigsten ungünstig.« Nur auf diesem erhielten sie Myzelien und schließlich auch vereinzelte Sporangienträger. »Auf Heu- und Mistagar war das Wachstum ähnlich, aber schlechter« (p. 868). Weder Änderungen der Konzentration der einzelnen Substanzen noch der Temperatur gaben bessere Resultate, so daß die Autoren schließlich zu den für ihre Zwecke genügenden Rohkulturen zurückgreifen mußten.

Gelegentlich der Inangriffnahme anderer Fragen ergab sich das Bedürfnis, über Reinkulturen von *Pilobolus* zu verfügen, dessen Substrat leicht und immer wieder in derselben Beschaffenheit herzustellen sein sollte, um ein möglichst gleichmäßiges Gedeihen der Pilze zu erzielen. Die bisher vorliegenden Beobachtungen waren nicht sehr ermutigend. Einige orientierende Versuche führten aber auf einen gangbaren Weg. Die vorliegenden Beobachtungen stellen einen ersten Beitrag zur Ernährungsphysiologie von *Pilobolus* dar. Zur Durchführung der Versuche wurde mir seitens der Akademie eine Subvention aus dem Wedl-Legat zur Verfügung gestellt, für die ich mir auch an dieser Stelle meinen Dank auszusprechen gestatte.

---

[1] Siehe auch die vorläufige Mitteilung im Anzeiger Nr. 1 der Akademie der Wissenschaften in Wien vom 10. Jänner 1929.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Versuche.

Die Gewinnung von Rohkulturen bereitete keine Schwierigkeiten. Im feuchten Raum aufgestellte Proben von Pferdemist (oder auch andere Mistarten) lieferten fast ausnahmslos nach etwa 6 bis 7 Tagen eine oft massenhafte Vegetation irgendeiner *Pilobolus*-Art. *Pilobolus Kleinii* herrschte auf Pferdemist bei weitem vor, doch war er oft genug mit *P. sphaerosporus* vergesellschaftet. Nur ausnahmsweise fanden sich auch andere Pilobolen *(heterosporus, cristallinus)*, welche aber in auffallender Weise andere Mistsorten bevorzugten, wie Ziegen-, Reh-, Hirsch- und Kuhmist. Die Sporangien ließ ich gegen darübergestülpte sterile Glasglocken abschießen. Von hier wurden dann einzelne Sporangien mittels steriler Glasnadel abgenommen und als Ausgangspunkt zu weiteren Kulturen benutzt. Das erste Kulturmedium, das ich versuchte, war Pferdemistagar. Dazu wurde 1 *kg* frischer Pferdemist mit 2·5 *l* Leitungswasser 1 Stunde lang gekocht, abgepreßt, die Flüssigkeit nach Kolierung durch ein Tuch mit 1·5% Agar versetzt und sterilisiert. Dieser PM-Agar, wie er weiterhin heißen mag, war tief dunkelbraun und von feinen, suspendierten Teilchen noch stark getrübt. Nur in ganz dünnen Schichten war er durchscheinend oder durchsichtig. Dieser Agar wurde zu Kolben oder in Portionen à 5 cm^3 zu Schrägeprouvetten verarbeitet und mit einem Sporangium geimpft. Die Kulturerfolge waren über Erwarten günstig. Die Keimung erfolgte oft schon nach 24 Stunden, worauf ein dichtes Myzel den Nährboden durchzog. Die Sporangienentwicklung setzte bei günstiger Temperatur schon nach 4 bis 5 Tagen ein und dauerte viele Tage, bis sie mit der allmählichen Erschöpfung des Nährbodens nachließ. Die Zahl der abgeschossenen Sporangien betrug in einer solchen Eprouvette viele Hunderte. Fast alle Kulturen gingen normal auf. Nur in einigen Fällen, auf die ich noch zurückkomme, waren die Resultate ungünstig oder negativ. Dieser PM-Agar wurde daher in der Folge für die Herstellung der Reinkulturen und als dauernder Zuchtboden für die verschiedenen *Pilobolus*-Stämme verwendet. Von diesen wurde dann für die späteren Versuche abgeimpft.

Die Reinkultur gelang meist leicht. Die von den Glasglocken abgeimpften Sporangien waren nur selten mit anderen Mukorineen infiziert, fast immer aber mit Bakterien. Schon die zweite oder dritte Agarpassage brachte aber sichere Reinkulturen. Leider ließ es sich aber weiterhin nicht immer vermeiden, daß einzelne Kulturen immer wieder von Bakterien infiziert wurden. Der mir zur Verfügung stehende Raum war auf die Dauer nicht so keimfrei zu halten, wie dies in einem bakteriologischen Zimmer möglich gewesen wäre. Auch stand mir kein Impfkasten zur Verfügung. In den meisten Fällen wurde die Entwicklung der Pilobolen dadurch nicht gestört. Doch sah ich auch Fälle, wo die Entwicklung des Myzels und insbesondere der Sporangien bei schwächeren Kulturen ganz unter-

drückt wurde. Solche Kulturen sind bei der Beurteilung der Ergebnisse weggelassen oder zumindest ausdrücklich erwähnt.

Für alle weiterhin zu beschreibenden Kulturversuche wurde ein Stamm Nr. 1 verwendet, auf einem in Graz gesammelten Pferdemist aufgegangen, der auch weiterhin auf PM-Agar sehr gut und kräftig gedieh. Nach der Gestalt der Sporangienträger, der Kolumella und der Form und Farbe der Sporen ist er nach der Nomenklatur Palla's (1900) als *Pilobolus Kleinii* Tiegh. anzusprechen. Nur in einzelnen Fällen wurden auch andere Stämme zu Kulturversuchen herangezogen. Darauf wird in den betreffenden Fällen noch hingewiesen.

Orientierende Versuche mit Peptonagar, dem verschiedene Substanzen, wie Glucose, Saccharose, Stärke u. a. zugesetzt wurden, brachten nur Mißerfolge. Es war daher naheliegend anzunehmen, daß im Pferdemist eine Substanz enthalten sei, an die der *Pilobolus* besonders angepaßt sein müsse. In der mir zugänglichen Literatur fand ich nur spärliche und ungenügende Angaben über die Zusammensetzung des Pferdemistes. Ich war daher auf eigene Versuche angewiesen. Die Tatsache, daß in dem verarbeiteten Pferdemist außer Hafer auch größere Mengen Heu und Strohhäcksel enthalten waren, brachte mich auf den Gedanken, daß vielleicht auch unverdaute Pentosane oder Pentosen vorhanden sein könnten, die als Energiequelle in Betracht kämen.

Gleich der erste darauf hinzielende Versuch schien diese Vermutung zu bestätigen.

Versuch 1 (Protokoll-Nr. 1).

Es wurde ein Nährmedium folgender Zusammensetzung hergestellt:

Auf 1000 Teile H_2O:

KH_2PO_4 ..	1·6
CaCl	0·2
$MgSO_4$	0·6
Pepton (Witte)	2·0
Käufl. Gummi arab...	....20·0

3 Schrägeprouvetten wurden am 27. Mai geimpft. Schon nach drei Tagen waren mit der Lupe Hyphen auf der Agarfläche zu sehen. Am 3. Juni begann die Bildung von Wurzel- und Stielblasen und am nächsten Tage konnte der erste, zwar kleine, aber normal entwickelte Sporangienträger beobachtet werden, der im Laufe des Tages sein Sporangium abschoß. Am 8. Juni wurde der Versuch abgebrochen. Es waren bis dahin in jeder der drei Eprouvetten 8, 6 und 5 Sporangien abgeschossen worden. Das Resultat war zwar nicht hervorragend, aber der eingeschlagene Weg schien Erfolg versprechend. Die im Gummi vorhandenen Substanzen (vielleicht Arabinose!) hatten jedenfalls für Keimung und Myzelbildung aus-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

gereicht, nicht aber für eine reichliche Sporangienbildung. Die Arabinose schien also nicht das Richtige zu sein.

Da in Stroh, Heu und Hafer Arabinose meines Wissens nicht vorkommt, dagegen reichlich Xylan oder Xylose (siehe nähere Angaben bei Czapek), so stellte ich verschiedene Versuche teilweise auf natürlichen Nährmedien, teilweise auf synthetischen Nährboden an. Ich berichte zunächst über die ersteren.

I. Versuche auf natürlichen Nährmedien.

Versuch 2 (Protokoll-Nr. 7).

Unreife, abgefallene Äpfel wurden mit wenig Wasser kurz aufgekocht (wobei bekanntlich lösliche Pektine reichlich ausgezogen werden), koliert, die Flüssigkeit in der Hitze bis zum Gelieren eingeengt (Apfelgelée), mit 1·5% Agar und 1% Pepton versetzt und zu Eprouvetten verarbeitet. Nach 25 Tagen waren selbst bei mikroskopischer Kontrolle keine Keimungen eingetreten.

Versuch 3 (Protokoll-Nr. 8 *a*).

Weizenstrohhäcksel wurde mit Wasser einige Stunden gekocht, 1·5% Agar und 1% Pepton zugesetzt und in Portionen à 50 cm^3 in Kolben gefüllt. Das Stroh war also im Nährmedium mit enthalten. Schon nach 9 Tagen setzte kräftige Sporangienbildung ein, die ununterbrochen anhielt und auch am 22. Tage, als der Versuch abgebrochen wurde, noch nicht erschöpft war. Die Zahl der abgeschossenen Sporangien war nicht zu zählen, dürfte aber schätzungsweise über 500 betragen haben.

Versuch 4 (Protokoll-Nr. 8 *b*).

Etwa 5 *g* Strohhäcksel wurde mit Wasser und reichlichem Ammoniakzusatz (Alkalien extrahieren bekanntlich das Xylan) zirka 2 Stunden gekocht und das Ammoniak am Wasserbad bei gelinder Wärme vollständig verjagt. Stroh samt Flüssigkeit wurde in Portionen à 50 cm^3 in Kolben gefüllt, so daß die festen Strohbestandteile gerade aus der Flüssigkeit emporragten. Ein Teil der Kolben erhielt einen Zusatz von 1% Pepton. Nach 10 Tagen begann schon in allen Kolben der Sporangienabwurf. Auch in diesem Falle war die Zahl der Sporangien nicht zu zählen. Die Kolben ohne Pepton blieben aber merklich in Größe und Anzahl zurück.

Versuch 5 (Protokoll-Nr. 10).

Zirka 5 *g* Strohhäcksel wurde auf dem Wasserbad mit ammoniakhältigem Wasser einen Tag lang extrahiert, der Extrakt mehrmals abgegossen und durch frisches Extraktionsmittel ersetzt. Die gesammelten Extrakte wurden auf dem Wasserbad eingeengt und dabei das Ammoniak vollkommen vertrieben. Die Flüssigkeit,

deren Volumen zirka 30 cm^3 betrug, wurde, mit 1·5% Agar und 1% Pepton versetzt, in Kolben gefüllt. Nach 23 Tagen war keine Keimung eingetreten (mikroskopische Kontrolle!).

Versuch 6 (Protokoll-Nr. 19).

Zirka 5 *g* Strohhäcksel wurden mit 1 *l* Wasser 3 Stunden im Dampftopf erhitzt, die Flüssigkeit filtriert, am Wasserbade auf 100 cm^3 eingeengt und mit 1·5% Agar zu Eprouvetten verarbeitet. 15 davon wurden mit *Pilobolus Kleinii* (Kultur Nr. 1), 4 mit *P. sphaerosporus* (Kultur Nr. 2 *a*) geimpft. Leider erwiesen sich alle Kulturen infiziert. Dennoch wuchs das Myzel sehr kräftig aus und nach 60 tägiger Kultur war in 13 *Kleinii*- und in 3 *sphaerosporus*-Eprouvetten reichliche Sporangienbildung eingetreten (oft über 100 pro Röhrchen).

Versuch 7 (Protokoll-Nr. 9).

Strohhäcksel wurde wie in Versuch 4 mit Ammoniakwasser behandelt, reichlich Xylan (siehe darüber unten) in Brocken und 1% Pepton zugesetzt und in Kolben gefüllt. Nach 23 Tagen war auch bei mikroskopischer Kontrolle keine Keimung eingetreten.

Wir ersehen aus diesen Versuchen, daß Weizenstroh selbst, mit und ohne Pepton, für *Pilobolus* einen ausgezeichneten Nährboden darstellt. Dasselbe ist der Fall mit dem durch kochendes Wasser erzeugten Extrakte. Es muß daher das Stroh die für die Ernährung des Pilzes notwendigen Stoffe enthalten. Auch scheinen diese im Wasser relativ leicht löslich zu sein.

Daß der ammoniakalische Extrakt *Pilobolus* nicht einmal zum Keimen gebracht hat, kann zwei Ursachen haben. Erstens können durch das Ammoniak die in Betracht kommenden Nährstoffe (also in erster Linie Xylan, N-Verbindungen usw.) nicht extrahiert worden sein. Zweitens können Reste von Ammoniak (an CO_2 oder anderweitig gebunden) in dem Extrakte zurückgeblieben sein und die Entwicklung verhindert haben. Der erste Fall dürfte kaum in Betracht kommen, nachdem schon die rein wässerigen Extrakte als Nährboden geeignet sind. Es ist auch nicht anzunehmen, daß das Ammoniak die Extraktion der Nährstoffe gehindert hatte, um so mehr als gerade Alkalien in erster Linie Xylan lösen. Es dürfte daher der zweite Fall viel mehr Wahrscheinlichkeit haben, wofür auch der Umstand spricht, daß auch in späteren Versuchen sich gerade die Ammoniaksalze als vollkommen ungeeignet erwiesen.

Auch lösliche Pektine, für die ein Gehalt an Pentosen angenommen wird (v. Wisselingh), scheinen ganz ungeeignet zu sein.

II. Versuche auf künstlichen Nährmedien.

Für einen Teil dieser Versuche stellte ich mir nach Angaben von Salkowski (1900/1901) aus Weizenstrohhäcksel Xylan her.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Zu diesem Zweck wird das Häcksel mit Natronlauge gekocht und die kolierte Flüssigkeit mit Fehling'scher Lösung gefällt. Der Kupfer-Xylan-Niederschlag wird mit Salzsäure zerlegt, mit Alkohol gefällt und so lange damit gewaschen, bis $CuCl_2$ und NaCl entfernt sind. Dann wird entwässert und getrocknet. Bezüglich der näheren Details verweise ich auf das Original. Aus 100 *g* Stroh erhielt ich so zirka 15 *g* Xylan, eine graue, bröcklige, schwer zerreibliche Masse.

Versuch 8 (Protokoll-Nr. 2).

Es wurde ein Agar wie in Versuch 1 hergestellt, der 2% Xylan enthielt statt Gummi arabicum. 4 Schrägeprouvetten wurden geimpft. Schon am 7. Tag konnte man eine ganze Menge Wurzelblasen beobachten. Vom 9. Tag an wurden dann täglich Sporangien abgeschossen. Als der Versuch am 26. Tag abgebrochen wurde, betrug die Zahl der abgeschossenen Sporangien in jeder Eprouvette: 69, 84, 57, 72. Summe: 282. Mittel: 70.

Die Sporangienträger waren im allgemeinen schmächtiger und kleiner, ebenso die abgeschossenen Sporangien, doch zweifellos normal. Eine Abimpfung auf PM-Agar ergab kräftige Entwicklung.

Nach diesem Erfolg wurden nunmehr eine ganze Anzahl verschiedener Substanzen auf ihren Nährwert für *Pilobolus* untersucht. Ich führe daher in der Folge die tunlichst abgekürzten Ergebnisse meiner Protokolle mit den notwendigen Erläuterungen an und werde die Resultate im Zusammenhange besprechen.

Für alle späteren Versuche wurde ein weiterhin als NS-Agar zu bezeichnender Nährsalz-Agar von folgender Zusammensetzung verwendet:

Auf 1000 Teile H_2O:

Agar..	15·0
KH_2PO_4.	1·0
CaCl	0·1
$MgSO_4$.	0·3

Dieser wurde nach Bedarf mit verschiedenen organischen Substanzen versetzt.

Versuch 9 (Protokoll-Nr- 4 *a*).

Zu einem NS-Agar mit 1% Xylan wurde je 1% folgender Substanzen zugesetzt: Glykokoll, Asparagin, Harnstoff, Pepton, Ammonazetat, Ammonsulfat und Leuzin (Merck) (dieses aber nur zu 0·4%, da es mir augenblicklich ausgegangen war). Je 5 Eprouvetten und 1 Kolben jeder Kombination wurden am 5. Juli geimpft. Da die folgenden Tage sehr heiß waren, ging die Entwicklung sehr rasch vor sich, so daß schon am 6. Tage Sporangien abgeschossen wurden: allen voran in den Leuzin-Röhrchen. Die nach 37 Tagen durchgeführten Zählungen der abgeschossenen Sporangien ergaben folgende Zahlen:

	In den Eprouvetten:	Summe	In den Kolben:
Leuzin...	....23, 38, 14, 41, 37	153	305
Pepton ..	.41, 25, 37, 19, 46	168	72
Glykokoll	5, 6, 6. 5, 4	26	14
Asparagin..	8, 7, 7, 6, 13	41	46
Harnstoff ..	0.	0	0
Ammonazetat....	0,	0	0
Ammonsulfat	0,	0	0

Bei Darreichung von Xylan als C-Quelle wird also Leuzin und Pepton am besten ausgewertet.

Bei Darreichung von Galaktose statt Xylan und Pepton als N-Quelle unter sonst gleichen Bedingungen wie oben, ergaben sich folgende Zahlen (abgeschossener Sporangien):

8, 6, 4, 8, 13 Summe: 39.

Versuch 10 (Protokoll-Nr. 6 *a*).

NS-Agar mit 1% Xylan und einem Zusatz von 0·5% $CaCO_3$ praecip.[1] wurde auf Röhrchen verteilt. Je 2 Eprouvetten erhielten folgende Zusätze: Glutamin, Leuzin (Merck), Asparagin, Alanin, Glykokoll, Tyrosin, Gelatine; und zwar je 1%, wenn in der Eprouvette nur eine Substanz allein enthalten war; sonst je 0·5% bei Verwendung zweier verschiedener Substanzen. Die folgende Tabelle gibt die Art der Kombinationen an und gleichzeitig die Anzahl der abgeschossenen Sporangien nach 18 tägiger Kultur.

	Glutamin	Leuzin	Asparagin	Alanin	Glykokoll	Tyrosin	Gelatine
Glutamin ...	7, 8	13, 11	21, 31	18, 9	7	9, 10	
Leuzin .		23, 15	15, 17	19, 13	12, 11	16, 20	
Asparagin ..			32, 18	18, 14	17, 17	6, 0	
Alanin ..				5	4, 12	1, 17	
Glykokoll ..					11, 9	9, 11	
Tyrosin ..						0, 1	
Gelatine .. .							0, 0, 0

[1] In einem Teil der Versuche wurde dem Agar eine geringere Menge von $CaCO_3$ praecip. hinzugefügt, um eine gleichmäßige Reaktion des Nährbodens zu sichern. Besonders manche Aminosäuren zeigten stark saure Eigenschaften. Auch das Xylan war trotz größter Sorgfalt nicht ganz Cl-frei zu bekommen und gab ebenso wie der Agar dem ganzen Nährboden saure Reaktion. Durch Zugabe von $CaCO_3$ zu PM-Agar, der ebenfalls leicht sauer ist, überzeugte ich mich, daß die Entwicklung von *P. Kleinii* und *sphaerosporus* in keiner Weise beeinträchtigt wird.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Ein ganz ähnlicher Versuch mit Galaktose statt Xylan ergab folgende Zahlen:

Glutamin	Leuzin	Asparagin	Alanin	Glykokoll	Tyrosin	Gelatine
6, 1	0, 0	2, 1	0, 0	0, 0	8, 4	20, 21

Versuch 11 (Protokoll-Nr. 16 *b*).

NS-Agar + 0·5% $CaCO_3$ bekam als C-Quelle Xylanzusatz. Xylan I war das ältere Präparat, welches vom Sommer 1928 stammte, während Xylan II im Frühjahr 1929 hergestellt war. Als N-Quellen wurden zugesetzt: Pepton, Leuzin (Schuchart), Kasein, Glykosamin, Nuklein, Liebig's Fleischextrakt. Die Konzentration betrug 0·5%. Die Kombinationen und die Zahl der abgeschossenen Sporangien pro Eprouvette gibt die folgende Tabelle. Jede Gruppe umfaßte 5 Röhrchen. Die in Klammer gesetzten Zahlen geben die jeweiligen Dimensionen der 10 größten Sporangien (Durchschnittswert) in Teilstrichen wieder. Kulturdauer 16 Tage.

	0	Pepton	Leuzin	Kasein	Glykosamin	Nuklein	Liebig
Xylan I, 0·5%.	0	20 (11)	1 (7)	0	0	5 (10)	21 (11)
Xylan I, 1·0%.	0	22 (11)	1	0	0	0	15 (9)
Xylan II, 0·5%.	0	19 (11)	3	0	0	46 (13)	37 (13)
Xylan II, 1·0%.	0	15 (14)		5 (11)	0	25 (14)	33 (12)
0		7 (10)	0	1	1	38 (16)	57 (13)

Versuch 12 (Protokoll-Nr. 12).

NS-Agar wurde mit 1% Pepton und 0·5% $CaCO_3$ versetzt. Dazu kamen verschiedene C-Quellen in 1% Konzentration: Glukose, Fruktose, Saccharose, Galaktose, Reisstärke, Mannit, Malz, Inulin, Liebig's Fleischextrakt. Je 3 Röhrchen wurden damit gefüllt. Zwei davon wurden mit *P. Kleinii* (aus Kultur Nr. 1), eine mit *P. sphaerosporus* (aus Kultur Nr. 2 *a*) geimpft. Das Ergebnis nach 34 tägiger Kultur bringt folgende Tabelle auf p. 363.

Alle geprüften Substanzen, mit Ausnahme von Liebig's Fleischextrakt, erwiesen sich also als schlechte C-Quellen. In einzelnen Fällen scheint sich *P. sphaerosporus* etwas verschieden zu verhalten.

Versuch 13 (Protokoll-Nr. 15 *a*).

NS-Agar mit $CaCO_3$ wie vorher, wurde mit folgenden Zusätzen zu 0·1% versetzt: Pepton, Kasein (nach Hammarsten), Leuzin

Tabelle zu Versuch 12.

C-Quelle	*P. Kleinii*	*P. sphaerosporus*
1. Glukose	Sporen anscheinend unverändert; nicht gekeimt	Einige wenige Sporen mit dünnen, farblosen Schläuchen gekeimt
2. Fruktose	Ebenso	Reichlicher gekeimt; Hyphen etwas unregelmäßig, knotig
3. Saccharose	2 Keimschläuche. Sporen sonst anscheinend unverändert	2 Keimschläuche. Sporen sonst unverändert
4. Reisstärke	Vereinzelt gekeimt. Alle übrigen Sporen vergrößert und vakuolisiert, zum Teil mit Keimschlauchansatz	Vereinzelt gekeimt. Alle übrigen Sporen vergrößert und vakuolisiert 2 Sporangienträger
5. Galaktose ..	Je 1 dünner Keimschlauch; sonst unverändert	Einige wenige Sporen gekeimt; sonst unverändert
6. Mannit ..	Einzelne Sporen mit Keimansatz; sonst unverändert	Fast alle Sporen mit dünnen, farblosen Hyphen gekeimt
Malz ..	Eine einzelne dünne Hyphe; sonst unverändert	Alle Sporen, soweit feststellbar, gekeimt. Mit dicken, knotigen Hyphen den Agar überallhin durchsetzend, aber ohne Sporangienbildung
8. Liebig's Fleischextrakt ..	Eprouvette 1: Sporen vollkommen unverändert Eprouvette 2: 2 bis 3 ausgekeimte Sporen; das Myzel den Agar überallhin durchziehend. Die übrigen Sporen zur Hälfte vergrößert u. vakuolisiert Etwa 20 abgeschossene Sporangien	Sporen reichlich gekeimt; das Myzel den ganzen Agar durchziehend Über 100 abgeschossene Sporangien
9. Inulin ..	Sporen vereinzelt gekeimt; sonst unverändert	Alle Sporen, soweit feststellbar, gekeimt; teils mit kurzen, an der Spitze angeschwollenen, teils mit langen, dünnen Hyphen den ganzen Agar durchziehend

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

(Schuchart), Nuklein (aus Hefe), Asparagin, Albumin (aus Eiern), Liebig's Fleischextrakt, salzsaures Glykosamin. Je 3 Röhrchen wurden damit beschickt. 5 Röhrchen ohne Zusatz dienten als Kontrolle. Die Resultate gibt die folgende Tabelle, 20 Tage nach der Impfung.

	Zahl der abgeschossenen Sporangien in den einzelnen Röhrchen	Summe
Kontrolle ..	0, 1, 1,	4[1]
Pepton ..	1, 4,	10
Kasein ..	3,	10
Leuzin .	0, 1, 3,	4
Nuklein	24, 17,	65
Asparagin .	4, 4,	13
Albumin	9, 9,	23
Liebig	29, 21, 39,	89
Glykosamin..	3, 2, 1,	6

[1] In der Rubrik »Summe« wurde die auf 3 Eprouvetten berechnete Zahl eingesetzt, um einen Vergleich mit den übrigen Zahlen zu ermöglichen.

Wie im vorigen Versuch zeigt besonders Liebig's Fleischextrakt üppige Sporangienbildung, ebenso Nuklein, während die anderen Substanzen wenig geeignet zu sein scheinen. Allerdings ist nicht zu übersehen, daß die betreffenden Stoffe hier C- und N-Bedarf gleichzeitig decken müssen.

In den folgenden Versuchen sind nun auch eine ganze Anzahl Kombinationen von C- und N-Quellen geprüft worden.

Versuch 14 (Protokoll-Nr. 15 *b*).

Eprouvetten sind mit NS-Agar + $CaCO_3$ gefüllt, der Zusätze von je $0 \cdot 1\,\%$ zweier Substanzen enthält, entsprechend der unten wiedergegebenen Tabelle. Die Zahlen geben die Summe der in den Kulturen (Summe aus je 3 Röhrchen) nach 20 Tagen abgeschossenen Sporangien.

	Liebig	Nuklein	Kasein	Pepton	Glykogen	Glykosamin	Leuzin	Asparagin	Albumin	Arabinose	Xylan
Nuklein	45										
Kasein	23	34									
Pepton	8	33									
Glykogen	18	39	4	0							
Glykosamin	25	25	3	1	3						
Leuzin		19			1	1					
Asparagin	20	27			6	1					
Albumin	24				11	4					
Arabinose	13	25	2	0	0	1	2	3	5		
Xylan	19	41	4	5	0	5	0	4	11	1	
Laktose	7	24	4	8	0	1	0	4	6	0	0

Versuch 15 (Protokoll-Nr. 16 *a*).

Verschiedene Konzentrationen von Nuklein und Liebig's Fleischextrakt in NS-Agar + $CaCO_3$ wurden untereinander kombiniert, wie es in der untenstehenden Tabelle wiedergegeben ist. Die Zahlen geben die Anzahl der abgeschossenen Sporangien pro Röhrchen (jede Gruppe umfaßt 5 Eprouvetten) an; die in ( ) stehenden Zahlen bezeichnen den jeweiligen Durchmesser der zehn größten Sporangien (Durchschnittswert) in Teilstrichen. Kulturdauer 16 Tage.

Liebig %	Nuklein			
	0	0·2	0·5	1·0
0·0	2·6 (8·5)	17 (12·5)	47 (15)	55
0·2	48	57 (18·5)	68 (18)	
0·5	86 (13)	153 (19·0)	85 (19)	
1·0	87 (15·5)			

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Stickstoffquellen.

Wie aus den angeführten Versuchen zu entnehmen ist, lassen sich die untersuchten N-Quellen entsprechend ihrem Nährwerte in eine absteigende Reihe bringen, die folgendermaßen aussieht:

Liebig's Fleischextrakt
Nuklein (aus Hefe)
Albumin, Pepton
Asparagin
Leuzin
Kasein
Glykokoll, Alanin, Glutamin
Salzsaures Glykosamin
Tyrosin
Gelatine, Harnstoff, NH_4-Salze

Es fällt vor allem auf, daß die einfachen Aminosäuren weniger gut geeignet sind als die komplizierteren Verbindungen, wie Pepton und Albumin. An der Spitze stehen Liebig's Fleischextrakt und Nuklein. Die Versuche verhalten sich aber nicht einheitlich. In Versuch 9 und 10 stehen Leuzin und Asparagin bezüglich ihrer Eignung an der Spitze, während nach Versuch 11, 13 und 15 Leuzin gerade zu den am wenigst günstigen Stoffen gezählt werden müßte. Dies hängt aber sicherlich damit zusammen, daß das in den ersten zwei Versuchen verwendete Leuzin von Merck (Darmstadt) bezogen wurde und, als dieses ausging, ein Präparat von Schuchart (Görlitz) verwendet wurde, das sich von dem Merck'schen Leuzin zwar nicht im Aussehen, wohl aber durch einen deutlichen Geruch unterschied.

Auffallend und überraschend ist die ausgesprochene Bevorzugung von Nuklein und Liebig's Fleischextrakt. Dies würde darauf hinweisen, daß alle übrigen untersuchten Substanzen nur als Notbehelf angenommen werden und daß diese beiden Präparate Stoffe enthalten müssen, die von *Pilobolus* besonders bevorzugt werden.

Kaum geeignet scheinen salzsaures Glykosamin und Gelatine zu sein, mit Ausnahme des vorläufig noch isolierten Falles in Versuch 10, wo Gelatine gleichzeitig mit Galaktose gegeben wurde. Einfachere Verbindungen, wie Harnstoff und Ammonsalze scheinen dagegen ganz ungeeignet zu sein.

Die Kohlenstoffquellen.

Auch in bezug auf die C-Quellen erweist sich *Pilobolus* nach den Versuchen als sehr wählerisch. Die sonst für Bakterien und Pilze gebräuchlichen und gern genommenen Substanzen werden nicht verarbeitet. Diese sind: Glukose, Fruktose, Galaktose, Saccharose, Laktose, Malz, Reisstärke, Inulin, Mannit, Arabinose. Dagegen zeigen die Versuche 8 bis 11, daß relativ gutes Wachstum zu erzielen ist auf Xylan, also einem Pentosan. Immerhin sind auch hier auffallende Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen zu bemerken, wie etwa bei Nr. 11. In diesem Falle wurden zwei Xylan-

präparate verglichen, die sich zwar in der Art der Darstellung durchaus nicht unterscheiden, aber verschieden alt sind; Xylan I ist im Sommer 1928, Xylan II im Frühjahr 1929 hergestellt. Es bestätigt sich hier vielleicht der Verdacht, der gelegentlich eines anderen Versuches aufstieg, daß nämlich Xylan I in seinem Nährwert abgenommen hat. Dies würde auch erklären, warum in Versuch 14 die Kombinationen Xylan-Pepton, -Asparagin, -Albumin ganz aus der Reihe fallen.

Überraschend ist ferner, daß Nuklein und Liebig's Fleischextrakt auch als C-Quellen geeignet sind. Versuch 16 zeigt, daß jede Substanz für sich einen genügenden und vielfach besseren Nährstoff darstellt als die sonst untersuchten Kombinationen. Gemeinsam verabreicht übertreffen sie an Nährwert alle bisher geprüften Stoffe, mit Ausnahme der Kulturen auf PM-Agar.

Allgemeines.

Obwohl die vorliegenden Versuche ihrer Zahl nach noch ungenügend und in manchem Punkte ergänzungsbedürftig sind, so läßt sich immerhin daraus folgendes entnehmen:

I. *Pilobolus* stellt im Gegensatz zu manchen anderen Koprophyten an das Nährsubstrat ganz besondere Ansprüche.
II. Als C-Quelle konnte bisher nur Xylan als brauchbar nachgewiesen werden. Es enthalten aber auch Nuklein und Liebig's Fleischextrakt Stoffe, die als C-Quellen in Betracht kommen.
III. Als N-Quellen werden nur kompliziertere Verbindungen gut verarbeitet. Einfachere N-Verbindungen (vielleicht mit Ausnahme von Leuzin[1]) sind für die Ernährung ungenügend. Dagegen erweisen sich Nuklein und Liebig's Fleischextrakt als besonders günstige N-Quellen.

Punkt I ist deshalb bemerkenswert, weil ziemlich allgemein angenommen wird, *Pilobolus* sei leicht zu kultivieren.

Was die vergeblichen Kulturversuche von Pringsheim und Czurda betrifft, so kann ich hier nur wiederholen, daß im Gegensatz zu ihren Erfahrungen die Kultur von *Pilobolus* auf PM-Agar im allgemeinen auf keine Schwierigkeiten stößt und mir daher die Mißerfolge der genannten Autoren nicht verständlich sind. Allerdings muß hier darauf aufmerksam gemacht werden, daß sich nach meinen Erfahrungen nicht alle in Kultur genommenen Stämme gleich verhielten. Ich habe im Verlaufe der Zeit 40 Stämme verschiedenster Herkunft in Kultur genommen. Davon gedieh der größere Teil (30) auf PM-Agar sehr gut, während andere Stämme nur mühsam keimten, sich langsam entwickelten, spärliche und kleine Sporangien abwarfen und auch die sonst monatelang erhaltene Keimkraft der Sporen bald verloren. Trotz öfteren Überimpfens gingen mir daher

[1] Das Leuzin des Handels enthält bekanntlich mindestens L-Leuzin und D-Leuzin.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

eine ganze Anzahl von Stämmen ein. Der überwiegende Teil der gezogenen Stämme war *P. Kleinii* (16) und *P. sphaerosporus* (16), während *P. cristallinus* (6) und *P. heterosporus* (2) nur vereinzelt anzutreffen waren. Der größere Prozentsatz der eingegangenen Kulturen betraf die letzteren zwei Arten, und zwar: *heterosporus* (alle Kulturen eingegangen), *cristallinus* (2 Kulturen: 33%); dagegen: *sphaerosporus* (nur 4 Kulturen: 25%) und *Kleinii* (nur 2 Kulturen, 12%). Nach der von Pringsheim und Czurda gegebenen Beschreibung dürften die von ihnen kultivierten Pilobolen *Kleinii* und *sphaerosporus* (nach der Palla'schen Nomenklatur) gewesen sein. Gerade diese sind aber nach meinen Erfahrungen auf PM-Agar leicht zu kultivieren. Es wäre allerdings denkbar, daß der von ihnen verwendete Pferdemist-Agar nicht ganz der Zusammensetzung meines PM-Agars entsprach. Ich konnte mich in einem eigens angestelltem Versuche überzeugen, daß die Konzentration des Pferdemistextraktes im Agar für die Entwicklung des *Pilobolus* nicht gleichgültig ist. Der von mir gewöhnlich verwendete PM-Agar wurde mit NS-Agar verdünnt, und zwar in folgenden drei Stufen: 1 1, 1 3, 1 : 6. Der Erfolg war, daß die Pilobolen zwar in allen Röhrchen wuchsen, daß aber die Entwicklung auf dem unverdünnten Agar am stärksten war, während auf der Verdünnung 1 6 keine oder nur einige wenige Sporangien gebildet wurden. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Zusammensetzung des Agars und vielleicht auch schwächliche *Pilobolus*-Stämme für die negativen Resultate von Pringsheim und Czurda verantwortlich zu machen sind.

Die Schwierigkeiten der Kultur von *Pilobolus* werden verständlich, wenn man seine Ansprüche an die C-Quelle betrachtet. Trotz seiner saprophytischen Lebensweise ist *Pilobolus* als Spezialist aufzufassen, der, soweit sich dies aus den vorliegenden Versuchen entnehmen läßt, streng auf Pentosen oder Pentosane eingestellt ist. Und auch hier scheint noch eine besondere Vorliebe für einzelne davon vorzuliegen, denn Arabinose wird kaum verwertet. Es bleibt freilich weiteren Versuchen vorbehalten zu entscheiden, ob nicht doch auch andere Pentosen oder Methylpentosen (etwa Ribose, Rhamnose, Fukose) oder vielleicht die entsprechenden Alkohole (Adonit usw.) verwertet werden können. Diese Möglichkeit ist nicht ganz von der Hand zu weisen, nachdem die Versuche zeigen, daß ein besonders gutes Wachstum auf Nuklein und Liebig's Fleischextrakt zu erzielen ist.

Nuklein und die in diesem vorhandene Nukleinsäure enthält bekanntlich im Molekül eine Pentose, die d-Ribose (Czapek, I, p. 268). Ebenso ist es bekannt, daß im Fleischextrakt Abbauprodukte der tierischen Nukleine vorkommen, welche ebenfalls d-Ribose abspalten. Schließlich wäre es ja nicht unmöglich, daß im Fleischextrakt auch Pentosen vorkommen, nachdem Slowtzoff (1901/02) durch Fütterungsversuche nachweisen konnte, daß Xylan im Muskel gespeichert wird. Bei der Bereitung des Extraktes müßten sicherlich Xylan oder Xylose in Lösung gehen und daher im fertigen Extrakt

enthalten sein. Von dem tatsächlichen Vorkommen solcher Stoffe im Fleischextrakt kann man sich durch eine Probe überzeugen. Versetzt man Liebig's Fleischextrakt mit einer gesättigten Lösung von Phlorogluzin in 20% Salzsäure, so erhält man beim Erwärmen eine kirschrote Färbung (Czapek, Tollens). Ebendieselbe Reaktion kann man mit künstlich hergestelltem Xylan oder Arabinose erhalten. Freilich ist hier einzuwenden, daß die Abbauprodukte der tierischen Nukleine mit Rücksicht auf ihren Ribosegehalt diese Reaktion auch geben können. In der ziemlich reichhaltigen Literatur über Fleischextrakt (König) konnte ich keine Angaben über ein Pentosenvorkommen finden.

Daß Hemizellulosen, also im wesentlichen Pentosen und Pentosane, von Pilzen verarbeitet werden, ist bekannt. Ich verweise besonders auf Czapek. Doch sind diese Pilze meist keine extremen Spezialisten. Manche unserer gemeinen Schimmelpilze sind hierher zu rechnen, wie auch gewisse Parasiten und Hemiparasiten (Schellenberg); doch zeichnen sich gerade diese dadurch aus, daß sie auch auf einer ganzen Reihe von anderen Substraten (besonders Zucker und ähnliche) ganz ausgezeichnet gedeihen. Gerade auf Mist wachsen eine ganze Reihe von Pilzformen, die in der Natur sonst selten oder gar nicht zu finden sind. Diese koprophile Flora enthält zweifellos manchen Spezialisten in bezug auf die Ernährung. Denn vielfach gelingt die Kultur nur auf verschiedenen Mistarten oder auf deren Dekokt, nicht aber auf anderen Nährböden (Brefeld, Brunswick, Schweizer). Gerade bei *Pilobolus* spielen die unverdauten Pentosane, die die tierischen Fäzes noch reichlich enthalten, eine scheinbar ausschlaggebende Rolle für die Ernährung.

Schließlich wäre zu bemerken, daß die vorliegenden Angaben für *Pilobolus Kleinii* gelten und daß nur zu einzelnen Versuchen auch *P. sphaerosporus* herangezogen wurde (Versuch 6 und 12). Nach den auf PM-Agar und in diesen Versuchen gemachten Erfahrungen keimen die Sporen von *sphaerosporus* leichter und schneller, und zwar auch auf Substraten, die als Nährboden nicht gerade geeignet sind (z. B. Stärke, Inulin, Mannit). Auch im Kondenswasser an den Wänden der Kulturgefäße keimen die Sporen der abgeschossenen Sporangien sehr leicht, was bei *P. Kleinii* nicht ohne weiteres der Fall ist. Im übrigen scheint zwischen den beiden Arten kein durchgreifender Unterschied zu bestehen.

Etwas anders liegen die Verhältnisse vielleicht bei *P. cristallinus* und *heterosporus*. Ich fand *P. cristallinus* nur ein einziges Mal auf den untersuchten Pferdemistproben, dagegen öfters auf Hirschlosung und vereinzelt auch auf Kuh- und Ziegenmist. Freilich kann diese Verteilung unter der relativ geringen Zahl der Proben (etwa 50) eine rein zufällige sein. Dagegen habe ich *P. heterosporus* nur zweimal auf Kuhmist gefunden. Dieses Vorkommen scheint für diese Art charakteristisch zu sein. Auch Palla gibt an, daß er ihn zwar wiederholt, aber bisher ausschließlich auf Kuhmist beobachtet habe, und zwar »nur selten in größerer Menge. .meistens

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

nur sporadisch unter anderen Arten« (p. 3 des Sonderabdrucks). Möglicherweise liegt hier eine gewisse Anpassung oder Spezialisierung vor, die ich aber bisher nicht weiter verfolgen konnte, da mir, wie schon erwähnt, die Kulturen bald eingingen. Ich gedenke die Untersuchungen fortzuführen.

Zusammenfassung.

1. *Pilobolus Kleinii* und *sphaerosporus* lassen sich auf Pferdemistdekokt-Agar ohne Schwierigkeiten kultivieren. Eine Anzahl Stämme ging aber trotz günstiger Kulturbedingungen und öfterem Überimpfen aus bisher unbekannten Ursachen ein. Die Konzentration des Pferdemistdekokt-Agars ist jedenfalls für ein günstiges Gedeihen des Pilzes maßgebend.

2. Die an absoluten Reinkulturen durchgeführten Ernährungsversuche ergaben folgende Resultate:

I. Die untersuchten N-Quellen lassen sich in drei Gruppen einteilen: *a)* günstige, wie Pepton, Albumin, Leuzin, Asparagin; *b)* kaum genügende, wie Kasein, Glykokoll, Alanin, Glutamin; *c)* ungenügende, wie Harnstoff, Glykosamin, Ammonsalze.

II. Auch die C-Quellen lassen sich in zwei natürliche Gruppen gliedern: *a)* Entwicklung bis zur Sporangienbildung, besonders mit Xylan, weniger gut mit Gummi arabicum, Arabinose, Galaktose; *b)* Entwicklung auf die Bildung von Myzel beschränkt oder überhaupt keine Entwicklung, mit Stärke, Inulin, Fruktose, Glukose, Saccharose, Laktose, Mannit.

3. Gekochtes Weizenstroh (mit und ohne Pepton) und dessen Extrakte stellen ebenfalls günstige Nährböden dar; nicht aber Pektine (Apfelgelée).

4. Nuklein und Liebig's Fleischextrakt ergeben für sich besonders gute Entwicklung, was sich daraus erklären dürfte, daß Nukleinsäure Pentosen enthält und Abbauprodukte der Nukleine auch im Fleischextrakt vorkommen, wofür auch der positive Ausfall der Phlorogluzin-HCl-Reaktion spricht.

5. Orientierende Beobachtungen an *P. sphaerosporus* Palla ergaben, daß sich dieser zwar durch leichtere und raschere Keimung, nicht aber in seinen Ernährungsverhältnissen von *P. Kleinii* Tiegh. unterscheidet. Möglicherweise könnte sich *P. heterosporus* Palla, der bisher nur auf Kuhmist gefunden wurde, ernährungsphysiologisch etwas anders verhalten.

Literatur.

Brefeld, O., Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze (Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie). Heft IV, 1881.

Brunswik, A., Untersuchungen über die Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomyzetengattung *Coprinus*. Goebel's botan. Abhandl., Heft 5, 1924.

Czapek, F., Biochemie der Pflanzen, G. Fischer, Jena, 1913/21.

Klein J., Zur Kenntnis des *Pilobolus*. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 8, 1872.

König, J., Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Berlin.

Palla, E., Zur Kenntnis der *Pilobolus*-Arten. Österr. bot. Zeitschr., 1900.

Pringsheim, E. G. und Czurda, V., Phototropische und ballistische Probleme bei *Pilobolus*. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 66, 1927.

Salkowski, E., Über die Darstellung des Xylans. Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiologische Chemie, Bd. 34, 1901/02.

Schellenberg, H. C., Untersuchungen über das Verhalten einiger Pilze gegen Hemizellulosen. Flora, Bd. 98, 1908.

Schweizer, G., Kulturmethode für koprophile Askomyceten. Planta, Bd. 7, 1929.

Slowtzoff, B., Über das Verhalten des Xylans im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 34, 1901/02.

Tollens, B., Über den Nachweis der Pentosen mittels der Phlorogluzin-Salzsäure-Absatz-Methode. Ber. chem. Ges., Bd. 29, 1896, p. 1202.

Wisselingh, C. van, Die Zellmembran, in K. Linsbauer's Handbuch d. Pflanzenanatomie, Teil I, Bd. III/2, 1924.